

[ノ ー ト]

静脈内および経口投与後のディオスゲニンのラットにおける体内動態

大川原正喜*, 徳留 嘉寛, 藤堂 浩明, 杉林 堅次, 橋本フミ恵
城西大学薬学部

Diosgenin Disposition in Rats after i.v. and p.o. Administration

MASAKI OKAWARA*, YOSHIHIRO TOKUDOME, HIROAKI TODO, KENJI SUGIBAYASHI and FUMIE HASHIMOTO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan
(Received 10 September 2009; Accepted 25 September 2009)

Summary: To elucidate elimination kinetics and skin disposition of diosgenin having several useful physiological activities and cosmetic effects on skin, plasma levels of diosgenin were followed after intravenous injection and oral administration in rats at the beginning of this study. Diosgenin was suspended in 1% polyoxyethylene hydrogenated ricinus solution. As a result of intravenous administration, the concentration-time profiles of diosgenin were best fitted to a one-compartment model. A good correlation ($r=0.980$) was found between the area under the plasma concentration-time curve (AUC_{po}) and dose after oral administration of 25, 50, 100 and 200 mg/kg diosgenin, suggesting no saturation took place in the elimination kinetics. Furthermore, the elimination half-life ($t_{1/2}$) was very long (19.2–23.4 h), and the absolute oral bioavailability was very low (3.1–6.3%). The diosgenin concentrations in skin 6 h after oral administration of 25, 50 and 100 mg/kg were 1.12, 3.65 and 4.43 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively, suggesting that diosgenin was distributed from systemic circulation to skin. Oral administration of diosgenin may be useful to obtain cosmetic effects on skin.

Keywords: diosgenin; intravenous administration; oral administration; skin distribution; LCMS

ディオスゲニンはトリテルペンに分類されるステロイドサポニンで, *Dioscorea villosa*, *Costus speciosus*, *Trigonella foenum graecum* などに含まれており¹⁾, 以前より糖尿病や高コレステロール血症に効果があると報告されてきた^{2,3)}. また, ディオスゲニンは, ステロイド骨格をもつためステロイドホルモンの工業的な出発原料として用いられており⁴⁾, 欧米ではエストロゲン様作用を期待して更年期症状の改善を目的として使用されてきた⁵⁾. エストロゲンは乳がん等のエストロゲン依存性腫瘍を増大させることが知られているが⁶⁾, ディオスゲニンを含有している *Dioscorea villosa* 抽出物は, 乳癌モ

デルマウスにおいて腫瘍を増大させなかったと報告されている⁷⁾. また, ディオスゲニンには卵巣摘出マウスにおいて表皮を肥厚させる作用も報告されており⁸⁾, 美容・健康食品の有効成分としても注目されている. しかし, 経口投与後の体内動態に関する報告は少なく, 皮膚等の組織への移行を調査した報告はないため研究課題が山積している.

本研究ではディオスゲニンのラットにおける体内動態を明らかにすることを目的として, ディオスゲニンを静脈内または経口投与した後の血漿中のディオスゲニン濃度を液体クロマトグラフ質量分析装置 (LCMS) によって測定し, その体内動態を確認した. また, 同時に経口投与後のディオスゲニンの皮膚移行性を確認した.

* 〒350-0295 坂戸市けやき台 1-1
城西大学薬学部皮膚生理学講座
TEL/FAX: 049-271-8140, E-mail: okawara@josai.ac.jp

実験の部

1. 試薬と実験動物

ディオスゲニン¹はSigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入した。ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 (HCO-60) は日光ケミカルズ (東京) より供与された。ペントバルビタールナトリウムは共立製薬 (東京) より購入した。6-メチルディオスゲニンおよびその他の試薬は和光純薬工業 (大阪) より購入した。雄性Wistar ラット (10 週令, 体重 246.6 ± 9.9 g) は日本 SLC (浜松) より購入した。飼料と水は自由に摂取させ、城西大学動物実験管理委員会の承認を得たのち城西大学動物実験倫理規定に従って実験を行った。

2. ディオスゲニン投与液の調製と投与方法

1.0% の HCO-60 を溶解させた生理食塩液にディオスゲニンを添加し PT1200E (Kinematica AG, Littau, Switzerland) を用いて 25,000 rpm で 1 分間懸濁させた。

ディオスゲニン投与時と採血時は適量のペントバルビタールナトリウムで麻酔した。静脈内投与実験では、ディオスゲニン 5, 10, 20 mg/kg をそれぞれ尾静脈より投与した。投与後 8 時間までは 2 時間ごとに、また以降は 24 時間ごとに 96 時間まで尾静脈より採血を行った。また、経口投与実験では、ディオスゲニン 25, 50, 100, 200 mg/kg を投与した。経口投与後 8 時間までは 2 時間ごとに、また以降は 24 時間ごとに 120 時間まで尾静脈より採血を行った。得られた血液サンプルは、 $3,000 \times g$, $4^{\circ}C$ で 10 分間遠心分離することにより分取し、ディオスゲニン濃度を定量するまで $-30^{\circ}C$ で保存した。

ディオスゲニン経口投与 6 時間後にラットを屠殺したのち速やかに腹部皮膚を採取した。採取した皮膚は皮下組織を丁寧に剥離し、ディオスゲニン濃度を定量するまで $-30^{\circ}C$ で保存した。

3. 血漿および皮膚中のディオスゲニン濃度の測定

血漿からのディオスゲニン抽出は、メタノール中で 1 分間 VORTEX-GENIE 2 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, U.S.A.) で振とうすることによって行った。皮膚組織はメタノール中で細かく刻み、1 分間 VORTEX-GENIE 2 で振とうすることによって抽出を行った。

抽出した試料は $15,400 \times g$, $25^{\circ}C$ で 5 分間遠心分離したのち、上清を分取し、窒素気流下で乾固した。

乾固した試料はメタノール:10 mM 酢酸アンモニウム (9:1) 溶液に溶解した。このとき、内部標準物質として 6-メチルディオスゲニンを $1 \mu g/mL$ となるように溶解し、LCMS の試料とした。

ディオスゲニンの定量には LCMS (LCQ DECA XPPlus, Thermo Fisher, Waltham, MA, U.S.A.) を使用した。移動相にはアセトニトリル:10 mM 酢酸アンモニウム (9:1) 溶液を、カラムは TSK gel ODS-80Ts 2.0×150 mm (TOSOH, 東京) を用い、室温で流量 $200 \mu L/min$ にて分離した。試料は $20 \mu L$ ずつ注入した。ディオスゲニンは m/z 253 のマスクロマトグラムより得られたピークを、また、6-メチルディオスゲニンは m/z 267 のマスクロマトグラムより得られたピークを検出した。

結果・考察

Fig. 1 にディオスゲニン、6-メチルディオスゲニンそれぞれ $1 \mu g/mL$ の濃度で注入したときのクロマトグラムを示す。LCQ DECA XPPlus を用いた時の血漿中ディオスゲニンの検出限界は $50 ng/mL$ 程度であった (図示せず)。

Fig. 2 にラットにディオスゲニンを静脈内に投与した後の血中濃度推移を示す。血中濃度の対数値を時間に対しプロットした時の直線の傾きより消失速度定数 kel (h^{-1}) を、切片より C_0 (ng/mL) を求めた。これらの数値を用いて、半減期 $t_{1/2}$ (h), 血中濃度-時間曲線下面積 AUC_{iv} ($\mu g/mL \cdot h$), 分布容積 V (L/kg), 全身クリアランス CL_{tot} ($mL/h/kg$) 等の動態パラメータを得た (Table I)。

静脈内投与実験の結果より、ディオスゲニンの全身循環系からの消失は 1-コンパートメントモデルに従うことが推察された。また、ディオスゲニンは高分布型で、消失半減期が約 20 時間と長いことが明らかとなった。さらに、 AUC_{iv} が投与量にほぼ比例していたことから、今回の投与量の範囲では消失過程の飽和は見られないと思われた。

Fig. 3 にディオスゲニンを経口投与した後の血中濃度推移を示す。ディオスゲニンの血中濃度の対数値は投与後 6 時間以降からほぼ直線的に減少した。そこで、6~72 時間における直線の傾きより kel を算出し、0~6 時間における血中濃度推移より吸収速

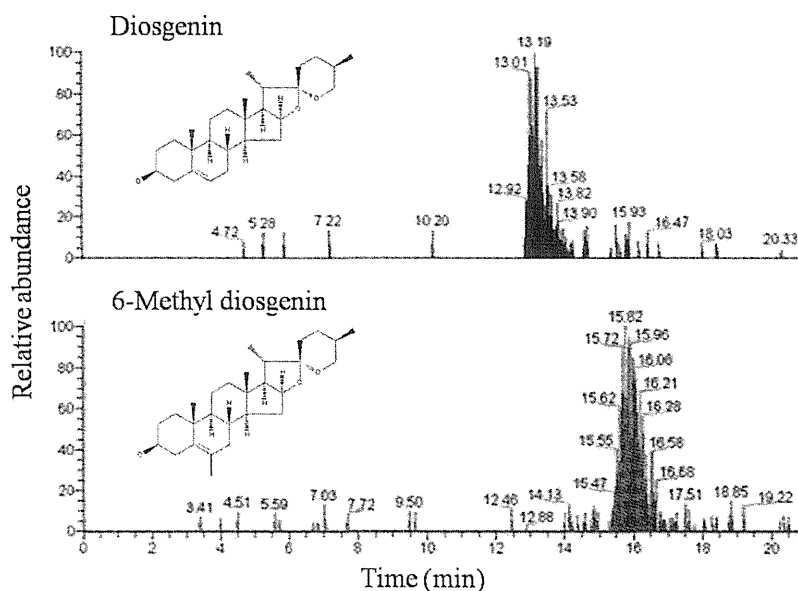


Fig. 1. Chromatograms of Diosgenin and 6-Methyl Diosgenin.

TABLE I. Pharmacokinetic Parameters of Diosgenin after Intravenous Administration to Rats.

Parameter	Dose (mg/kg)		
	5	10	20
k_{el} (h^{-1})	0.0331 ± 0.0110	0.0393 ± 0.0142	0.0354 ± 0.0037
C_0 (ng/mL)	634 ± 423	2243 ± 672	2862 ± 582
$t_{1/2}$ (h)	23.4 ± 9.9	19.2 ± 5.5	19.7 ± 1.9
AUC_{iv} ($\mu g \cdot h/mL$)	19.4 ± 9.8	60.9 ± 9.3	82.0 ± 21.8
V (L/kg)	10.8 ± 6.7	4.5 ± 1.2	7.2 ± 1.5
CL_{tot} (mL/h/kg)	338 ± 221	167 ± 24	257 ± 66
MRT_{iv} (h)	33.7 ± 14.3	27.6 ± 8.0	28.5 ± 2.7
VRT_{iv} (h^2)	1291 ± 1143	815 ± 424	815 ± 148

Mean \pm S.D., $n = 5$.

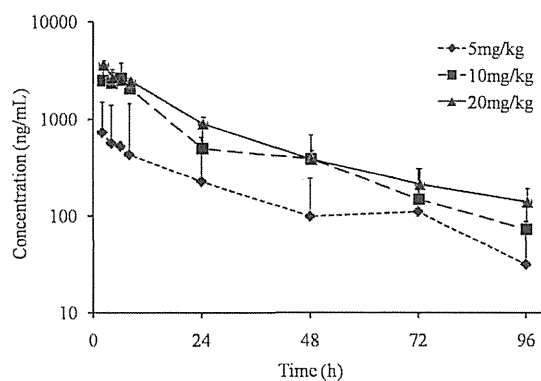


Fig. 2. Mean Plasma Concentration-Time Profiles of Diosgenin after Intravenous Administration to Rats.
Mean \pm S.D., $n = 5$.

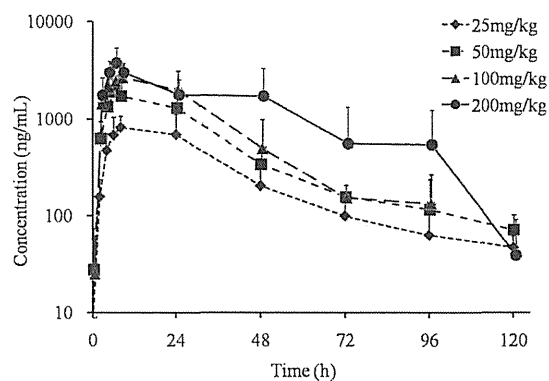


Fig. 3. Mean Plasma Concentration-Time Profiles of Diosgenin after Oral Administration to Rats.
Mean \pm S.D., $n = 5$.

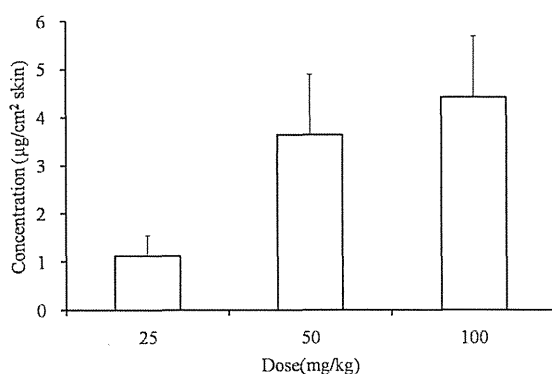
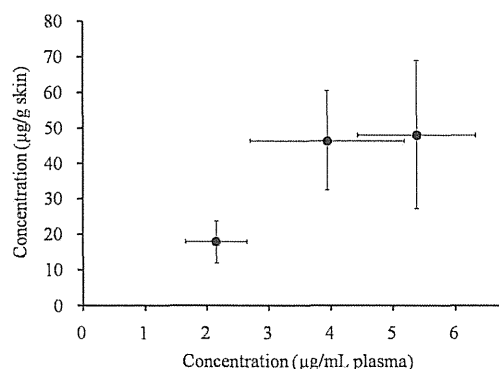
度定数 k_a (h^{-1}) を算出した. さらに k_{el} と k_a より AUC_{po} を算出し, AUC_{iv} との比より量的バイオアベイラビリティ F を算出した (Table II). 経口投与実験の結果より, デイオスゲニン是一次吸収過程

をもつことが推察された. また, AUC_{po} も投与量との間で比例関係を示し, 量的バイオアベイラビリティは約 5% と低いことが示された.

次に, デイオスゲニンを 25, 50, 100 mg/kg の用

TABLE II. Pharmacokinetic Parameters of Diosgenin after Oral Administration to Rats.

Parameter	Dose(mg/kg)			
	25	50	100	200
<i>kel</i> (h^{-1})	0.0338 ± 0.0067	0.0388 ± 0.0068	0.0457 ± 0.0071	0.0432 ± 0.0117
<i>ka</i> (h^{-1})	0.327 ± 0.068	0.863 ± 0.795	0.342 ± 0.094	1.481 ± 0.679
<i>AUC</i> _{po} ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$)	28.9 ± 15.0	56.5 ± 11.5	71.5 ± 17.5	112.3 ± 53.7
<i>tmax</i> (h)	8.01 ± 1.74	5.92 ± 3.66	7.16 ± 1.98	2.78 ± 1.05
<i>Cmax</i> (ng/mL)	729 ± 346	1709 ± 370	2321 ± 376	4111 ± 1570
<i>MRT</i> _{po} (h)	33.7 ± 7.1	28.9 ± 4.5	25.5 ± 4.4	25.0 ± 5.4
<i>VRT</i> _{po} (h^2)	975 ± 413	727 ± 269	519 ± 165	607 ± 228
<i>MAT</i> (h)	21.3 ± 7.1	16.5 ± 4.5	13.1 ± 4.4	12.6 ± 5.4
<i>F</i>	0.0633 ± 0.0330	0.062 ± 0.0126	0.0392 ± 0.0096	0.0308 ± 0.0147

Mean \pm S.D., $n = 5$.Fig. 4. Mean Skin Concentration-Dose Profiles of Diosgenin 6 h after Oral Administration to Rats.
Mean \pm S.D., $n = 3-4$.Fig. 5. Mean Skin Concentration-Plasma Concentration Profiles of Diosgenin 6 h after Oral Administration to Rats.
Mean \pm S.D., $n = 3-4$.

量で経口投与し、吸収過程がほぼ終了したと思われる6時間後の腹部の全層皮膚中のディオスゲニン濃度を測定した。その結果をFig. 4に示す。単位重量当たりの皮膚中のディオスゲニン濃度は25, 50, 100 mg/kgの用量でそれぞれ17.89, 46.42, 48.04 $\mu\text{g/g skin}$ であり、この値は単位面積当たりに換算すると1.12, 3.65, 4.43 $\mu\text{g/cm}^2$ であった。経口投与後であるにも関わらず、高い皮膚中ディオスゲニン濃度が得られた。また、皮膚中のディオスゲニン濃度は投与量に比例して増加した。そこで、同時に血漿中のディオスゲニン濃度を測定し、ディオスゲニンの血漿中濃度-皮膚中濃度をプロットした。Fig. 5にその結果を示す。ディオスゲニンを25, 50, 100 mg/kg経口投与した後6時間の血漿中濃度はそれぞれ2.15, 3.94, 5.38 $\mu\text{g/mL}$ となり、上述した皮膚中濃度と比較的高い相関性を示した($r=0.916$)。なお、皮膚中濃度は血漿中濃度に比べて高いことがわかった。前述したようにディオスゲニンは高分布型物質であるが、この理由が皮膚への高い分配にも起

因するものと思われた。

以上より、経口投与したディオスゲニンはおそらく全身循環系から皮膚に移行しているものと思われた。表皮の保湿に重要な役割を果たしているセラミドは経口投与後に皮膚に移行することが報告されている⁹⁾。セラミドと同様にディオスゲニンも経口投与により皮膚に移行する可能性が示され、ディオスゲニンを飲むことによって皮膚に移行し、皮膚において表皮肥厚や等の作用を発揮することが期待される⁸⁾。

今後は表皮や真皮中のより詳細な皮膚内ディオスゲニン濃度の測定を行うとともに経口投与後のバイオアベイラビリティを増加させるための製剤学的な検討を行う必要があると考えている。また、ディオスゲニンの経皮吸収や生理学的にどのような影響を与えるのかについても今後検討する予定である。

引用文献

- 1) M. Sautour, A.C. Mitaine-Offer, T. Miyamoto, A.

- Dongmo, M.A. Lacaille-Dubois, Antifungal steroid saponins from *Dioscorea cayenensis*, *Planta Med.*, **70**, 90–92 (2004).
- 2) M.A. McAnuff, W.W. Harding, F.O. Omoruyi, H. Jacobs, E.Y. Morrison, H.N. Asemota, Hypoglycemic effects of steroidal sapogenins isolated from Jamaican bitter yam, *Dioscorea polygonoides*, *Food Chem. Toxicol.*, **43**, 1667–1672 (2005).
- 3) M.N. Cayen, D. Dvornik, Effect of diosgenin on lipid metabolism in rats, *J. Lipid Res.*, **20**, 162–174 (1979).
- 4) N. Applezweig, Steroids, *Chem. Week.*, **17**, 57–72 (1969).
- 5) L. Russell, G.S. Hicks, A.K. Low, J.M. Shepherd, C.A. Brown, Phytoestrogens: A viable option?, *Am. J. Med. Sci.*, **324**, 185–188 (2002).
- 6) C.Y. Hsieh, R.C. Santell, S.Z. Haslam, W.G. Helfrich, Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Res.*, **58**, 3833–3838 (1998).
- 7) C.T. Chiang, T.D. Way, S.J. Tsai, J.K. Lin, Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast cancer cells through modulating Akt, mTOR and JNK phosphorylation, *FEBS Lett.*, **581**, 5735–5742 (2007).
- 8) Y. Tada, N. Kanda, A. Haratake, M. Tobiishi, H. Uchiwa, S. Watanabe, Novel effects of diosgenin on skin aging, *Steroids*, **74**, 504–511 (2009).
- 9) O. Ueda, M. Hasegawa, S. Kitamura, Distribution in skin of ceramide after oral administration to rats, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **24**, 180–184 (2009).